

بررسی اثرات تزریق لیدوکائین به داخل بخش سری شکمی - میانی بصل النخاع بر رفتارهای درد در آزمون‌های صفحه داغ و فرمالین در موش صحرایی

حسن ازدری زرمهری^{۱*} (Ph.D)، نیما حیدری اورنجی^۲ (B.Sc)، ندا سلیمانی^۳ (M.Sc)، محمد صوفی آبادی^{۴*} (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

۲- دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی

۳- دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

۴- دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات زیادی برای شناخت مراکز عصبی و مکانیسم‌های کنترل و تعدیل درد در جریان است، بخش سری شکمی-میانی بصل النخاع (Rostral ventromedial medulla, RVM) در اعمال مختلفی از قبیل تعدیل و تشدید درد دخالت دارد. در این مطالعه نقش RVM در آزمون فرمالین به عنوان درد تونیک و آزمون صفحه داغ به عنوان درد حاد به وسیله غیر فعال کردن موقتی آن به وسیله لیدوکائین در موش‌های صحرایی نر بررسی شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از موش‌های صحرایی نر سفید در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات به سه گروه کنترل، شم و آزمون تقسیم شدند. یک هفته پس از انجام جراحی، سالین یا لیدوکائین به RVM تزریق شد و آزمون فرمالین (با تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲٪ به کف پنجه راست حیوان) یا صفحه داغ (تنظیم شده در دمای ۵۲±۰/۱ درجه) انجام و رفتارهای درد ثبت شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون T-test و ANOVA استفاده گردید و $P < 0/05$ به عنوان معنی داری در نظر گرفته شد. یافته‌ها: تزریق لیدوکائین به درون RVM سبب کاهش درد در مرحله نخست آزمون فرمالین شد ولی روی مرحله اینترفاز و فاز ۲ آن تاثیری نداشت. همچنین در آزمون صفحه داغ تزریق لیدوکائین سبب بی‌دردی در هر ۴ دوره زمانی (۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) بعد از تزریق شد. نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که تزریق لیدوکائین به داخل RVM سبب کاهش درد نوع حاد شده ولی بر درد مزمن تاثیری ندارد. بنابراین می‌توان احتمال داد که این بخش از سیستم عصبی در فرایند انتقال و یا پردازش درد حاد اهمیت دارد.

واژه‌های کلیدی: اندازه‌گیری درد، لیدوکائین، بخش سری شکمی - میانی بصل النخاع، موش صحرایی

مقدمه

خاکستری دور قناتی (Periaqueductal gray, PAG) و بخش سری شکمی - میانی بصل النخاع

مراکز فوق نخاعی مهم در تعدیل درد، سیستم ماده

(Rostral ventromedial medulla, RVM) می‌باشد. RVM به عنوان خروجی ساقه مغز عصب‌گیری فشرده‌ای از PAG دریافت می‌کند و به شاخ خلفی نخاع از طریق مسیرفانیکلوس پشتی - پهلویی ارسال می‌کند [۲،۱]. ورودی‌های مستقیم کمی از ساختار مغز جلویی و هیپوتالاموس به RVM وجود دارد و این نواحی بیش‌تر از طریق PAG بر RVM تأثیر می‌گذارند [۳]. هم‌چنین RVM و PAG به دلیل وفور گیرنده‌های اپیوئیدی در بی‌دردی ناشی از اپیوئیدها شرکت می‌کنند و قسمتی از اثرات ضد درد آن‌ها به دلیل مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز و کانابینوئیدها می‌باشد [۴]. و بخشی از اثرات ضد درد RVM از مسیر سیستم کاتکول آمینرژیک به‌ویژه گروه‌های سلولی نوع A7 وساطت می‌شود، به‌نحوی که این انشعابات از اکسون‌های پایین‌رونده به شاخ پشتی نخاع می‌رسند و موجب تعدیل درد در شاخ پشتی نخاع می‌شوند [۵،۶].

پیام‌های رسیده به PAG از مناطق مختلفی از مغز چون آمیگدال و هیپوتالاموس و هم‌چنین مسیر اسپینومزانسفالیک در RVM دست‌خوش تغییراتی شده و سپس به نخاع ارسال می‌شود. تغییراتی که در RVM اعمال می‌شود از طریق نورون‌های مختلف تحریکی (On-cell) و مهاري (Off-cell) می‌باشد [۸،۷] و در واقع اثرات مهاري و تسهيلي درد در RVM به همین دلیل است. آزمون فرمالین رفتارهای دردی تونیک ایجاد می‌کند و درد مرحله‌ای اول ناشی از تخریب بافتی و تحریک گیرنده‌های محیطی می‌باشد و نمودی از درد حاد است و مرحله‌ای دوم ناشی از تحریک اعصاب محیطی و افزایش حساسیت نورون‌های مرکزی می‌باشد و نمودی از درد مزمن می‌باشد [۹،۱۰]. و مرحله اینترفاز که رفتارهای دردی کاهش و یا به صفر می‌رسد مورد علاقه بسیاری از محققین است و از آن‌جا که آزمون فرمالین به طور گسترده‌ای در شناسایی داروهای بی‌دردی استفاده می‌شود و این تأثیر این داروها بر مراحل مختلف آزمون فرمالین متفاوت است شناسایی مناطق مغزی که در به‌وجود آوردن این فازها مورد اهمیت می‌باشد. اگرچه غیر فعال‌سازی RVM به دنبال

پردردی ناشی از استرس مزمن بررسی شده، اما تا به حال مطالعات زیادی در زمینه مراکز عصبی و مکانیسم‌های دخیل در تولید و تعدیل رفتارهای دردی آزمون فرمالین انجام نشده است و هم‌چنین مدل آزمون فرمالین به عنوان مدل درد تونیک با آزمون صفحه داغ به عنوان درد حاد که مکانیسم عصبی آن در سطح فوق نخاعی پردازش می‌شود با هم در RVM بررسی و مقایسه نشده‌اند. لذا در این مطالعه اثر نقش RVM از طریق حذف موقت آن با تزریق لیدوکائین بر درد ناشی از تزریق فرمالین به عنوان درد مزمن و التهابی و نیز آزمون صفحه داغ به عنوان درد حاد در موش صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی سفید نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم تهیه شده از انستیتو رازی استفاده شد. حیوانات در قفس‌های بزرگ و دمای ثابت 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۲ ساعته با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایشات به‌وسیله کمیته اخلاقی دانشکده علوم پزشکی قزوین تأیید شد. آزمایش‌ها بر اساس راهنمای اخلاقی موسسه بین‌المللی مطالعه درد انجام شدند. همه تلاشمان در این راستا بود که سطح درد و استرس و نیز تعداد موش‌های مورد استفاده را کاهش دهیم.

موش‌ها به ۳ گروه ده تایی شامل گروه کنترل، شم و لیدوکائین تقسیم‌بندی شدند. به جز گروه کنترل دو گروه دیگر تحت جراحی استرئوتاکسی قرار گرفتند. به گروه شم نرمال سالین و به گروه سوم لیدوکائین به داخل RVM تزریق شد.

جراحی و کانول‌گذاری. جهت این امر ابتدا کانول‌گذاری در ناحیه RVM انجام شد. برای کانول‌گذاری، حیوان پس از بی‌هوش شدن با ترکیب ۱۰۰ mg/kg کتامین و ۱۰ mg/kg زایلازین در دست‌گاه استرئوتاکسی مستقر و پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده شد. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و با توجه به فاصله آن‌ها و نسبت آن با فاصله ذکر شده در اطلس

پاکسینوس [۱۱] نواحی سطح مجسمه متعلق به هسته RVM (AP:10.5-11, L:00) مشخص گردید. بعد از علامت‌گذاری مناطق فوق، با استفاده از مته دندان‌پزشکی در محل مذکور منفذی به اندازه قطر کانول راهنما، که معمولاً از سرسرنگ نمره ۲۳ است، ایجاد شده و کانول راهنما به اندازه ۲ میلی‌متر کوتاه‌تر از عمق مشخص در اطلس برای هسته مورد نظر (V:10.4)، به منظور کاهش آسیب هسته تا هنگام تزریق، در درون مغز مستقر شد و قسمت رویی آن در روی مجسمه به وسیله سیمان دندان‌پزشکی ثابت گردید. $\%MPE = \frac{\text{زمان پاسخ} - \text{زمان پایه پاسخ}}{\text{زمان پاسخ}} \times 100$ (پیچ عینک) در استخوان مجسمه تعبیه و در درون سیمان دندان‌پزشکی فرو رفت. این دو پیچ در حکم مسلح‌سازی سیمان بوده و از جدا شدن آن از سطح مجسمه جلوگیری می‌کند. منفذ کانول راهنما در بیرون مجسمه به وسیله درپوش خاصی مسدود شد و فقط در زمان تزریق دارو برداشته شد. بعد از اتمام جراحی موش یک هفته دوره بهبودی را طی کرد. یک کانول با اندازه‌ی نازک‌تر که از سوزن نمره ۳۰ است به اندازه‌ای که ۲ میلی‌متر طول‌تر از نوک کانول راهنما باشد تهیه و از یک طرف به یک لوله نازک پلی‌اتیلن وصل شد. سر دیگر لوله پلی‌اتیلن به سیستم ریز تزریق وصل شده و حجم ۰/۵ میکرولیتر ماده تزریقی در مدت زمان یک دقیقه با تکنیک پیش راندن حباب، به وسیله سرنگ هاملتون تزریق می‌شد و سوزن تزریق به مدت یک دقیقه در محل باقی می‌ماند [۱۲].

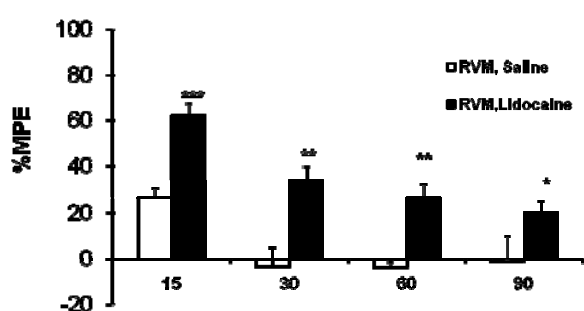
آزمون صفحه داغ. این آزمون یک روز قبل از آزمون فرمالین انجام شد. در این آزمون حرارت صفحه در 52 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. پس از قرارگیری حیوان روی این صفحه، مدت زمان لازم برای پاسخ حیوان به محرک درد (لیسیدن پنجه‌ها یا بیرون پریدن از محفظه‌ی پلاستیکی روی صفحه داغ) بر حسب ثانیه ثبت شد. جهت جلوگیری از آسیب بافتی زمان خاتمه‌ی آزمون (Cut-off time) ۶۰ ثانیه بود. این آزمون برای هر موش قبل و ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه بعد از تزریق دارو یا سالیین انجام می‌گرفت. به منظور عادت کردن حیوانات به محیط جهت به حداقل رساندن استرس، ۳ روز

قبل از آزمون صفحه داغ موش‌ها روزانه به مدت ۳ دقیقه برای آشنایی به محیط بر روی صفحه داغ خاموش قرار می‌گرفتند. همچنین برای کاهش اشتباهات انسانی تمامی این آزمون توسط یک فرد انجام شد.

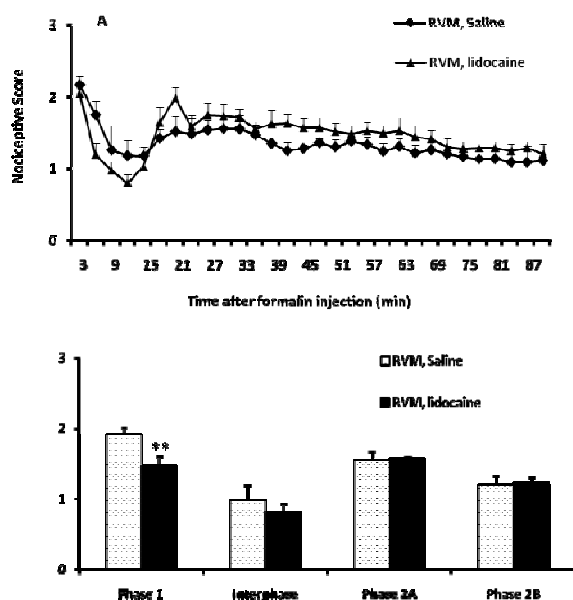
جهت بررسی درصد پاسخ‌دهی لیدوکائین به محرک دردآور حرارتی فوق و مقایسه آن با گروه‌های کنترل از حداکثر اثردهی ممکن (MPE%) استفاده شد که به شرح زیر است:

آزمون فرمالین. آزمون فرمالین یک روش ارزشمند و مدل مناسب برای سنجش و ارزیابی درد مداوم و پایدار ناشی از یک محرک شیمیایی می‌باشد و از سوی دیگر می‌توان اثرات درد حاد را نیز در طی فاز اول این آزمون بررسی کرد [۹، ۱۰]. برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲٪ به زیر پوست پنجه پای حیوان توسط یک سر سوزن نمره ۳۰ تزریق شد. به دنبال تزریق فرمالین، حیوان به یک محفظه شفاف با کف مسطح، به ابعاد $30 \times 30 \times 30$ از جنس پلاکسی‌گلاس که در زیر آن محفظه شفاف آئینه‌ای تعبیه شده است، قرار گرفت و رفتارهای دردی آن ثبت و امتیازدهی شد: نمره ۰ - پای حیوان به‌طور طبیعی روی زمین قرار داشت، نمره ۱ - پای حیوان مختصری روی زمین قرار داشت، نمره ۲ - پای حیوان از زمین کنده شده بود و نمره ۳ - حیوان پایش را گاز می‌گرفت و یا لیس می‌زد. از لحظه تزریق فرمالین به مدت ۹۰ دقیقه امتیازهای درد ثبت شد. سپس در هر دقیقه از امتیازها میانگین گرفته شد و پس از آن از هر ۳ دقیقه امتیازها هم میانگین گرفته شد. رفتارهای درد ناشی از تزریق زیر پوستی فرمالین از دو فاز تشکیل شده که توسط اینترفاز از یک‌دیگر جدا می‌شوند. فاز اول از دقیقه ۰ تا ۷ و مرحله اینترفاز از دقیقه ۸ تا ۱۴ (که در قسمت B شکل ۱ به صورت ستونی نشان داده شده است)، و فاز دوم از دقیقه ۱۵ تا ۹۰ را شامل می‌شد. جهت مشخص شدن بهتر یافته‌ها، فاز دوم به دو

اثر تزریق لیدوکائین به هسته RVM روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین. ۱۰ دقیقه پس از تزریق لیدوکائین به داخل RVM، فرمالین در کف پای حیوانات تزریق شد و رفتارهای دردی در بازه زمانی ۹۰ دقیقه ثبت شدند. تزریق لیدوکائین به داخل RVM سبب کاهش رفتارهای دردی در مرحله فاز ۱ آزمون فرمالین شد ($P < 0.01$) اما اثر معناداری بر رفتارهای دردی در اینترفاز و هر دو بخش ابتدایی و انتهایی فاز ۲ آزمون فرمالین در مقایسه با گروه سالین نداشت ($p > 0.05$, شکل ۲).



شکل ۱. مقایسه درصد بی دردی با استفاده از آزمون صفحه داغ در گروه سالین و لیدوکائین.



شکل ۲. نمره آزمون فرمالین برای ۹۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین (B). تزریق فرمالین سبب رفتارهای دردی شد که این رفتارها در فاز ۱ آزمون فرمالین در گروهی که تزریق لیدوکائین به RVM داشته اند کاهش معنی داری یافت ($P < 0.01$).

قسمت تقسیم شد: A از دقیقه ۱۵ تا ۶۰ و B از دقیقه ۶۱ تا ۹۰ [۱۶، ۱۵].

پس از انجام تمامی آزمایشات مورد نظر موش‌ها با کتامین بی‌هوش شده و سپس حجم ۵ میکرولیتر رنگ متیلین بلو ۲٪ از طریق کانول به مغز آن‌ها تزریق شد و بعد از گذشت سه تا پنج دقیقه به روش ترانس کاردیال، عروق مغزی آن‌ها شستشو داده شد. پرفیوژن با ۱۵۰ میلی‌لیتر سالین شروع شد و با ۵۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰٪ کامل شد. سپس مغز موش‌ها از جمجمه خارج شد و با برش‌گیری توسط ویبروتوم از ساقه مغز انجام شد. فقط داده‌های آن موش‌هایی که محل تزریق آن‌ها در RVM تایید می‌شد در نتایج آورده شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری T-test و ANOVA یک‌طرفه استفاده شد و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تلقی شد.

نتایج

اثر تزریق لیدوکائین بر درد ناشی از آزمون صفحه داغ. در این آزمون علامت بروز درد ناشی از قرارگیری روی صفحه داغ در دقایق ۱۵ قبل از تزریق (تحت عنوان Baseline) و ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ بعد از تزریق بر اساس واحد ثانیه ثبت شد. نتایج ما نشان داد که تزریق لیدوکائین به داخل RVM در هر ۴ دوره زمانی بعد از تزریق، باعث بی‌دردی نسبت به گروه سالین شد که بیش‌ترین بی‌دردی در ۱۵ دقیقه بعد از تزریق لیدوکائین به RVM ایجاد گردید ($P < 0.01$).

ثبت درد (Pain latency) در دقایق ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ بعد از تزریق صورت گرفت. تزریق لیدوکائین به داخل RVM سبب القاء بی‌دردی در تمام ۴ زمان پس از تزریق در آزمون صفحه داغ شد که نسبت به گروه سالین معنی‌دار بود.

رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین در کف پای حیوان. تزریق فرمالین سبب رفتارهای دردی در گروه کنترل و شم شد که در بازه زمانی ۹۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین ثبت شدند.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش، بیانگر کاهش معنی دار درد تنها در فاز ۱ آزمون فرمالین، پس از تزریق لیدوکائین به داخل RVM در مقایسه با تزریق سالین است. هم چنین تزریق لیدوکائین سبب ایجاد بی دردی در آزمون صفحه داغ در مقایسه با گروه سالین شد که نشان می دهد حذف موقتی ناحیه RVM سبب ایجاد بی دردی می شود.

فاز نخست آزمون فرمالین به عنوان مرحله حاد درد در نظر گرفته می شود. در واقع پاسخ فرمالین دو فازی است، در فاز اول (بلافاصله بعد از تزریق فرمالین) درد شدیدی شروع می شود که به وسیله فعال شدن فیبرهای C نسبت به تحریکات محیطی است. در فاز دوم یا فاز تاخیری که حدود ۲۰ دقیقه بعد شروع می شود، درد ملایم است که به وسیله تغییرات عمل کردی و بافتی در شاخ خلفی نخاع ایجاد می شود [۱۸، ۱۷]. به دلایل زیر از آزمون فرمالین در این پژوهش به دلایل زیر استفاده شده است: ۱- آزمون فرمالین تحریک دردناک مناسبی را فراهم می کند. ۲- نسبت به مدل های درد حاد، تحریک دردناک در آزمون فرمالین به طور مداوم می باشد و از این جهت می تواند مشابه درد کلینیکی باشد. ۳- حیوان آزمایشگاهی استرس کمتری را تجربه می کند. ۴- آزمون فرمالین دارای دو فاز می باشد که هر فاز نوع متفاوتی از درد را نشان می دهد [۱۰، ۹].

البته بین فاز ۱ و ۲ مرحله اینترفاز وجود دارد که برخی آن را به عنوان یک مرحله مهار غیر فعال می شناختند و شاید به این دلیل مورد توجه زیاد قرار نگرفته بود در حالی که چندین مطالعه گزارش کرده اند که مرحله اینترفاز به صورت فعال ایجاد می شود و به طور درون زاد، نتیجه مکانیسم های متوقف کننده درد می باشد [۱۹]. کاربرد لیدوکائین در تحقیقات فیزیولوژی به دلیل غیر فعال کردن کانال های سدیمی در نورون ها و غیر فعال کردن آن ها فراوان است [۲۰]. در مطالعه حاضر با استفاده از این ماده از فعال شدن RVM در حیوانی که در معرض درد است، جلوگیری شد و دیده شد که بی دردی تشدید می گردد، که هم راستا با پیشنهاد Cerrero در ۱۹۸۴

است که RVM به نام حلقه فیدیک مثبت به حساب می آید که توسط محرک های دردناک پرکار می شود این چنین حلقه فیدیک مثبت، احتمالاً موجود زنده را آماده می کند که با آستانه پایین تر و با سرعت بیش تر به ورودی های آسیب رسان بعدی پاسخ بدهد در همین راستا در یک پژوهش نشان داده شد که تحریک الکتریکی RVM در شدت های زیاد موجب افزایش حساسیت به درد شده و شدت های کم تحریک الکتریکی آن ایجاد بی دردی می نماید [۲۲، ۲۱]. در مطالعه دیگری به جای تحریک الکتریکی از تزریق ناقل عصبی تحریکی یعنی گلو تامات استفاده شد که نتیجه ای همانند تحریک الکتریکی به دست آمد و این مطالعه نقش گیرنده های NMDA را در فعال کردن RVM نشان داد [۲۴، ۲۳]. در آزمایشی دیگر زمانی که موش های نر صحرایی سفید متحمل درد سوزنی در ناحیه دم شده اند، بیان ژن C-fos در ناحیه RVM آن ها افزایش یافت که نشان دهنده افزایش فعالیت این ناحیه در زمان درد می باشد [۲۵]. تحقیقات موجود بیانگر وجود ۳ جمعیت نورونی متفاوت در RVM است. این ۳ دسته شامل on-cells و cells-off و neutral cells می باشد [۲۸-۲۶، ۲۰، ۲]. نقش نورون های on-cell در ایجاد پردردی خصوصاً پردردی ثانویه به خوبی مشخص شده است [۷]. با این ترکیب نورونی متفاوت، انتظار عمل کرد مختلف، پس از بروز انواع مختلف تحریکات دردناک دور از انتظار نیست. در همین رابطه گزارش شده که استفاده موضعی از کله سیستمیک در RVM سبب پردردی احشایی و پوستی می شود. کله سیستمیک در دوزی که سبب پردردی می شود سبب پرکار کردن On-cell ها می شود و On-cell ها پردردی کله سیستمیک را در RVM وساطت می کنند [۲۹]. استفاده موضعی از نوروتنسن نیز در دوز پایین سبب تسهیل درد و در دوزهای بالا سبب بی دردی می شود در حالی که در دوزهای میانی اثری ندارد. رفتار پردردی به وسیله پرکار کردن On-cell ها و بی دردی توسط بسیج Off-Cell ها وساطت می شود و سلول های خنثی به نوروتنسن پاسخ نمی دهند [۲۹]. در دوره های پردردی تعادل میان جمعیت on-cells و

در RVM در کنترل عمل کرد آن نقش دارند و شاید با فعال شدن تدریجی RVM اثر خود را بروز می دهند برای اثبات این فرضیه و نیز شناسایی ساز و کار دقیق نقش نورون های مختلف RVM بر درد حاد، آزمایشات بیش تری طراحی شوند.

به طور خلاصه در این پژوهش با حذف موقتی ناحیه سری شکمی-میانی بصل النخاع، کاهش رفتارهای حاد درد دیده شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری مرکز تحقیقات سلولی - ملکولی، گروه فیزیولوژی و معاونت پژوهشی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین در اجرای این تحقیق قدردانی می نمایند.

منابع

- [1] Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 184-202.
- [2] Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 2009; 60: 214-225.
- [3] Behbehani MM, Park MR, Clement ME. Interactions between the lateral hypothalamus and the periaqueductal gray. *J Neurosci* 1988; 8: 2780-2787.
- [4] Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 2005; 435: 1108-1112.
- [5] Neubert MJ, Kincaid W, Heinricher MM. Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 2004; 110: 158-165.
- [6] Heinricher MM, Neubert MJ. Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2004; 92: 1982-1989.
- [7] Fields HL, Heinricher MM. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 308: 361-374.
- [8] Heinricher MM, Barbaro NM, Fields HL. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens Mot Res* 1989; 6: 427-439.
- [9] Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995; 60: 91-102.
- [10] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
- [11] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates (4th and 6th edition), Academic Press, New York (1998 and 2007). 2005.
- [12] Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Rahmani A, Ghasemi-Dashkhasan E, Semnanian S, Haghparsat A. Blockade of orexin receptor 1 attenuates the development of morphine tolerance and

cells-offها به طرف فعالیت On-cellها جابه جایی پیدا می کند که با افزایش پاسخ دهی به محرک دردناک ارتباط دارد که توسط تخریب RVM بلوک می شود، بنابراین تحریک دردناک سبب بسیج سلول های RVM می شود که درد را تسهیل می کنند. هم راستا با این تحقیق Saade و همکاران در ۲۰۱۰ و ۲۰۱۲ [۳۰،۲۰] نشان دادند که تزریق لیدوکائین در RVM برای تولید کاهش قابل توجهی از تظاهرات نوروپاتی در موش صحرایی نشان داده شده است. این اثر به بلوک انتخابی از سیستم درد نزولی تسهیلی نسبت داده شده است. تفاوت این مقاله با مطالعه حاضر فقط در نوع مدل درد است. و همچنین مکانیسم آن را بررسی کرده اند.

نتایج دیده شده که عکس پژوهش ما می باشد. برای مثال نشان داده شده است که بلوک آنزیم آدنیل سیکلاز یا PKA از پردردی مکانیکی و الودینا القا شده به وسیله تزریق داخل پوستی، داخل عضلانی و یا داخل مفصلی کاپسایسین جلوگیری نموده که هم راستا با این تحقیقات مهار آدنیل سیکلاز در RVM سبب کاهش رفتارهای درد در آزمون فرمالین شده است [۳۲،۳۱]. همچنین تزریق مهارکننده آدنیل سیکلاز داخل منطقه سری شکمی - میانی بصل النخاع رفتارهای درد ناشی از آزمون فرمالین در موش صحرایی را کاهش داد [۳۳]. گزارشاتی وجود دارد که به هنگام درد حاد و یا مزمن نوع فعالیت RVM متفاوت بوده و اغلب تحت تاثیر نوع محرک و یا نوع آسیب وارده قرار می گیرد [۳۵،۳۴]. در پژوهش ما، تزریق لیدوکائین به RVM سبب کاهش رفتارهای درد در فاز ۱ آزمون فرمالین و نیز آزمون صفحه داغ شد، که هر دو شاید بیانگر تاثیر RVM بر پردازش و کنترل درد حاد باشد که بر طبق مستندات موجود احتمالاً به وسیله پرکار کردن نورون های On-cell صورت می گیرد. البته باید به اثر موقتی لیدوکائین هم توجه کرد، چرا که نیمه عمر کوتاهی در حدود ۳۰ تا ۴۰ دقیقه دارد [۲۰] اثرات آن در انتهای فاز A2 کم رنگ می شود و شاید برای همین در اینترفاز و فاز دوم آزمون فرمالین تشدید بی درد را نمی بینیم. البته بعضی نوروترانسمیترهای مهاری و تحریکی مثل گابا و گلو تامات هم

- [24] Heinricher MM, Neubert MJ. Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2004; 92: 1982-1989.
- [25] Zhou Z, He L, Zhou J. [Expression of C-fos protein in CNS following electroacupuncture of the "quanliao" and the electrostimulation of the rat tail]. *Zhen Ci Yan Jiu* 1993; 18: 14-20.
- [26] Heinricher MM, Neubert MJ. Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2004; 92: 1982-1989.
- [27] Heinricher MM, Martenson ME, Neubert MJ. Prostaglandin E2 in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 2004; 110: 419-426.
- [28] Heinricher MM. Nociceptin/orphanin FQ: pain, stress and neural circuits. *Life Sci* 2005; 77: 3127-3132.
- [29] Heinricher MM, McGaraughty S, Tortorici V. Circuitry underlying antiopioid actions of cholecystokinin within the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2001; 85: 280-286.
- [30] Saade NE, Al Amin AH, Tchachaghian S, Jabbur SJ, Atweh SF. Alteration of GABAergic and glycinergic mechanisms by lidocaine injection in the rostral ventromedial medulla of neuropathic rats. *Pain* 2010; 149: 89-99.
- [31] Sluka KA, Rees H, Chen PS, Tsuruoka M, Willis WD. Capsaicin-induced sensitization of primate spinothalamic tract cells is prevented by a protein kinase C inhibitor. *Brain Res* 1997; 772: 82-86.
- [32] Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci* 2002; 22: 5687-5693.
- [33] Goudarzvand M, Azhdari H, KhakpayR. Effect of adenylyl cyclase inhibitor (sq-22536) injection in rostral ventromedial medulla on formalin induced nociceptive behavior in rats. *Knowl Health* 2010; 4: 11-16.
- [34] Sluka KA, Rees H, Chen PS, Tsuruoka M, Willis WD. Capsaicin-induced sensitization of primate spinothalamic tract cells is prevented by a protein kinase C inhibitor. *Brain Res* 1997; 772: 82-86.
- [35] Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci* 2002; 22: 5687-5693.
- physical dependence in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 103: 212-219.
- [13] Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Ghasemi-Dashkhasan E, Esmaeili MH, Semnanian S. Intra-paragigantocellularis lateralis injection of orexin-A has an antinociceptive effect on hot plate and formalin tests in rat. *Brain Res* 2012; 1478: 16-23.
- [14] Heidari-Oranjaghi N, Azhdari-Zarmehri H, Erami E, Haghparsat A. Antagonism of orexin-1 receptors attenuates swim- and restraint stress-induced antinociceptive behaviors in formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 103: 299-307.
- [15] Azhdari-Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y. Comparing the analgesic effects of periaqueductal gray matter injection of orexin A and morphine on formalin-induced nociceptive behaviors. *Physiol Pharmacol* 2008; 12: 188-193. (Persian).
- [16] Azhdari-Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, Erami E, Khakpay R, Azizi H, Rohampour K. Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J Pain* 2011; 12: 280-287.
- [17]Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-158.
- [18] Dickenson AH, Sullivan AF. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* 1987; 26: 1235-1238.
- [19] Franklin KB, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 46: 661-666.
- [20] Saade NE, Al Amin HA, Barchini J, Tchachaghian S, Shamaa F, Jabbur SJ, Atweh SF. Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. *Exp Neurol* 2012; 237: 180-190.
- [21] Morgan MM, Heinricher MM, Fields HL. Inhibition and facilitation of different nocifensor reflexes by spatially remote noxious stimuli. *J Neurophysiol* 1994; 72: 1152-1160.
- [22] Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Mooney-Heiberger K, Martinez J, Furness L, et al. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res* 1994; 639: 283-299.
- [23] Morgan MM, Heinricher MM, Fields HL. Inhibition and facilitation of different nocifensor reflexes by spatially remote noxious stimuli. *J Neurophysiol* 1994; 72: 1152-1160.

Effects of lidocaine injections into the rostral ventromedial medulla on nociceptive behaviours in hot-plate and formalin tests in rats

Hassan Azhdari Zarmehri (Ph.D)^{1,4}, Nima Haidari-Oranji (B.Sc)², Neda Soleimani (M.Sc)³, Mohammad Sofiabadi (Ph.D)^{*4}

1- Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

2 - Paramedical school, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

3 - Physiology-Pharmacology Research Center, Rafsanjan University Of medical Sciences, Rafsanjan, Iran

4 - Dept. of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

(Received: 5 Agu 2012; Accepted: 8 Mar 2013)

Introduction: Many studies are being run to understand the mechanisms of pain modulation. Rostral ventromedial medulla (RVM) contributes to pain control by its attenuating and augmentation. In this study, we investigated the role of RVM in chronic and acute pain while RVM inactivated temporarily by lidocaine.

Materials and Methods: White rats (weighing 250-200 g) were used in this study. The animals were divided into three groups: control, sham and test group. One week after surgery, saline or lidocaine was injected into the RVM and the hot plate (set temperature 52 ± 0.1 °) and formalin test (injection of 50 μ L of formalin 2% to the right hindpaw) were performed and nociceptive responses were recorded.

Results: The intra-RVM injection of lidocaine reduced pain in the first phase of formalin test, but it had no effect on the interphase or second phase. Also the lidocaine injection caused analgesia in the hot plate test, in all four time period (60, 30, 15 and 90 minutes) after injection.

Conclusion: Our results showed that injection of lidocaine into the RVM could affect acute pain model, but it didn't show any effect on phase 2 formalin as chronic pain. So, it is likely that the RVM has a substantial role on acute pain through pain transferring or processing.

Keywords: Rostral-ventromedial Medulla, Formalin test, Hot plate test, Rat, Lidocaine

* Corresponding author: Fax: +98 281 3336005; Tel: +98 281 3336005

hasan.azhdari@gmail.com